

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：82111  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2010～2011  
 課題番号：22658097  
 研究課題名（和文）ヘモグロビン分解経路を基軸とするマダニの病原体伝搬制御機構の解明  
 研究課題名（英文）Studies on regulatory mechanism of pathogen transmission based on hemoglobin digestive cascade in ticks  
 研究代表者  
 辻 尚利 (TSUJI NAOTOSHI)  
 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所・細菌・寄生虫研究領域・主任研究員  
 研究者番号：70355171

研究成果の概要（和文）：マダニの中腸に構築されているヘモグロビン分解経路は、マダニの生存・繁殖を支える栄養代謝の中心的役割を果たすと同時に、吸血によって媒介される様々な動物やヒト病原体にも深く関与することを突き止めた。加水分解酵素とその阻害剤で構成される分解経路と伝搬される病原体との間には、ネットワーク化された時空間的な分子間相互作用が機能していることが分かった。

研究成果の概要（英文）：A hemoglobin digestive assembled in the midgut of ticks plays a central role for nutrition metabolism in tick survival and reproduction. Concurrently, the cascade consisted of proteolytic enzymes and their inhibitors are found to be associated with vector-transmitting a variety of human and animal pathogens by blood feeding. The results demonstrate that a network for the spatiotemporal intermolecular interaction is functioned between the hemoglobin digestive cascade and the transmitted-pathogens.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	0	1,900,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	360,000	3,460,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：獣医学、感染症、吸血性節足動物、マダニ、ヘモグロビン

1. 研究開始当初の背景

(1) 急務である現行殺ダニ剤に代わる新たなマダニ媒介感染症制圧技術の開発：ウイルスから寄生虫まで多種多様な病原体を媒介するマダニは、畜産振興の阻害のみならず、多数の新興・再興感染症の拡大をもたらすベクターでもあることから、人類にとって最も厄介な外部寄生虫である。特に、バベシア症に代表されるマダニ媒介性原虫病は、原虫の多様な抗原変異から、ワクチン開発は困難を

極め、ジミナゼン製剤の製造中止と相まって原虫病の根絶は極めて困難な状況が続いており、原虫病制圧に向けた研究戦略は立っていない。現在、マダニとマダニ媒介性原虫病の予防対策は、専らベクター駆除を目的とした殺ダニ剤に依存しているが、環境問題等々から、現行の化学的薬剤に代わる、難治性原虫病を中心とするマダニ媒介性疾病の予防と、清浄化を永続的に維持できる効果的な予防・治療法開発が、今や世界的な急務とな

っている。

(2) マダニ媒介感染症予防・治療薬開発の国内外の現状と問題点：殺ダニ剤のほぼ全ては農薬の転用・流用にすぎない状況が、世界的に半世紀以上も継続しており、これが、現在抱えている薬剤耐性マダニ、畜産物への薬物残留問題などの弊害を招いている。本来、抗マダニ薬開発は対象であるマダニに特有の生理や生存・繁殖の特性に立脚することを基盤とすべきであり、この原則から大きく逸脱した開発状況を早急に転換する必要がある。

(3) マダニ中腸における蛋白（宿主血液）エネルギー代謝経路の発見：我々はこれまでにマダニの宿主血液の吸血消化機構の解明を進めてきた。その結果、吸血で取り込まれた宿主血液の主要構成蛋白であるヘモグロビンは、中腸に存在するヘモグロビン分解経路（HbDC）によって分解・吸収されていることを明らかにした。HbDCとは、中腸上皮細胞内で蛋白分解酵素群とインヒビター群が協調的に機能して、ヘモグロビンをアミノ酸に分解する経路のことである。加えて、我々は、HbDC 参画分子群は中腸上皮細胞内でバベシア症の病原虫である、バベシア原虫の分化・増殖をも制御していることを突き止め、HbDC による病原体伝搬制御の可能性を示唆した。

## 2. 研究の目的

(1) マダニは宿主の血液を唯一の栄養源とする。そのため、人や動物にはない吸血生理を支える多彩な代謝経路が存在すると考えられているが、現在マダニの生存や繁殖の恒常性維持の基軸経路は未解明である。我々は、マダニ個体において、血液消化の中核と位置づけられる中腸の上皮細胞から、多種多様な加水分解酵素群とそのインヒビター群の同定によって、巧妙にプログラムされたヘモグロビン分解経路（HbDC）の存在を提唱し、さらに、HbDC 参画分子をノックダウンしたマダニでは、マダニ個体内でバベシア原虫の過剰伝搬が惹起され、原虫伝搬に破綻を来すことを突き止めた。さらに蛋白代謝と病原体伝搬に関与する、マダニ特有の Dual function な HbDC 機能を明らかにし、国内外で大きな反響を得た。我々は、HbDC ネットワーク下にある蛋白代謝と病原体伝搬を想定し、マダニが進化的に獲得したこの多様性の解明こそが、マダニ制圧の方策転換を強く方向づけできるとともに、有用・応用性に新領域をもたらすことができると考える。

(2) ヘモグロビン分解経路を標的としたマダニとマダニ媒介感染症制圧技術の開発：我々が特性解明に成功している各種 HbDC 参画分子に関する最新知見を活用し、バベシア原虫をモデル病原体として、原虫が中腸内を移行する期間に発現・変動する HbDC 参画分

子の特性解明を展開し、HbDC 代謝マップの作成を通して病原体伝搬が、制御されたネットワークによって営まれていることを論理的に記述することである。

## 3. 研究の方法

(1) ヘモグロビン分解経路参画分子 H1CPL 発現動態の解析

①フタトゲチマダニ（岡山株）の中腸 EST データベースより単離した、H1CPL cDNA をもとに、大腸菌発現蛋白として組換え H1CPL を作製し、各種合成基質及び Hb 標品を用いた加水分解活性を解析した。ウサギに付着させた成ダニを経時的に回収し、H1CPL 発現及び内在型 H1CPL の局在を定量 PCR 及び免疫蛍光組織染色を用いて解析した。

② *In vitro* における H1CPL と内在性インヒビターの分子間相互作用解析：上記の基質を用いて、H1CPL 活性に対する阻害効果をすでに単離に成功しているフタトゲチマダニのシスタチン 2 種について解析した。

③フタトゲチマダニにおける *in vivo* 機能解析：RNA 干渉法により作製した H1CPL ノックダウンマダニ（H1CPL k/d）を耳袋法によってウサギ体表に付着させ、表現型の解析、H1CPL 及びそのインヒビターの発現動態を定量 PCR 及び免疫蛍光組織染色を用いて経時的に解析した。

④HbDC を制御するインヒビターとして、新たにマダニキモトリプシン様インヒビター（H1ChI）を単離し、細胞生物学的及び *in vivo* での内在機能を明らかにするため組換え H1ChI とマダニ-哺乳類宿主系を用いた *in vivo* 解析を行った。

(2) フタトゲチマダニ cDNA のマイクロアレイ解析：*Babesia gibsoni* 感染犬（原虫の赤血球寄生率：25%）から吸血したフタトゲチマダニの飽血後 3 日目の中腸（BgH1Mg）と非感染犬から吸血したマダニの飽血後 3 日目の中腸（nH1Mg）を材料としたアレイによる遺伝子発現比較解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 新たなヘモグロビン経路参画分子の同定及びネットワーク構築されたヘモグロビン分解経路の発見

①ヘモグロビナーゼ活性を保有する H1CPL：H1CPL の加水分解活性は、カテプシン L/B 基質 ( $k_{cat}/K_m = 0.19 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) に対して、至適 pH 及び温度それぞれ 3.6 及び 37°C であり、ロイペプチン、アンチパイン及び E-64 によって活性が抑制されたことから H1CPL はシステインプロテアーゼであることが示された。また、SDS-PAGE 解析によって、酸性下での H1CPL 加水分解作用による Hb の断片化が確認された。H1CPL 及び内在型 H1CPL の発現は中腸上皮細

胞だけに認められ、付着後 48 時間まで発現が増大することが分かった (図 1)。

②H1CPL と共局在する 2 種のシスタチン：H1CPL の基質及び Hb 分解活性は、H1cyst-1 ( $IC_{50}$ : 7.9 nM  $\pm$  2.19) と H1cyst-2 ( $IC_{50}$ : 239.0 nM  $\pm$  8.65) によって阻害された。また、吸血期間における H1cyst-1, -2 の発現動態は、遺伝子発現及び局在とも H1CPL と類似することから、H1CPL の内在性インヒビターであることが強く示唆された (図 2, 3)。

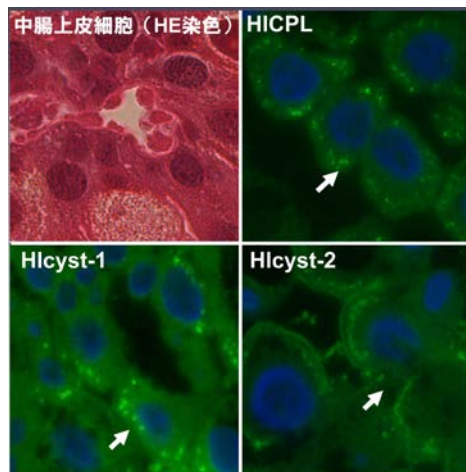


図 1 H1CPL と H1Cyst-1,2 の局在  
緑：Alexa488、青：DAPI (核)

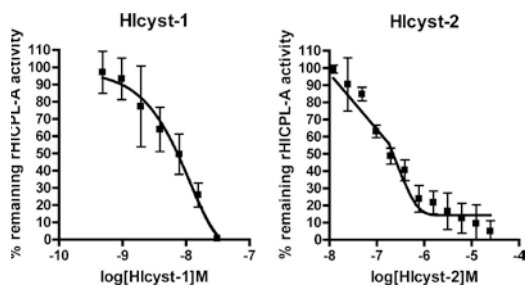


図 2 H1cyst-1,2 の H1CPL 加水分解阻害作用

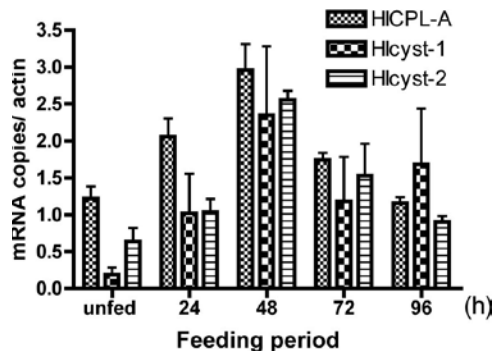


図 3 成ダニの吸血時における H1CPL, H1cyst-1,2 発現量の変化

③吸血消化不全を招く H1CPL ノックダウンマダニ：H1CPL k/d では *dsma1E* dsRNA 処理した対照群と比較して、宿主血液の摂取量低下が招来し、飽血前に半数が死亡、生存率の有意

な低下が確認された。組織学的に中腸上皮細胞のリモデリング抑制が観察され、中腸内腔には未消化な宿主血液が認められた。H1CPL の発現抑制は、H1cyst-1 及び-2 の発現量を減少させたが、HbDC 参画分子である H1Lgm-1, -2 の発現は増大させることが分かった。同時に、*longepsin* 及び H1SCPL の発現量も減少することが確認された (図 4)。

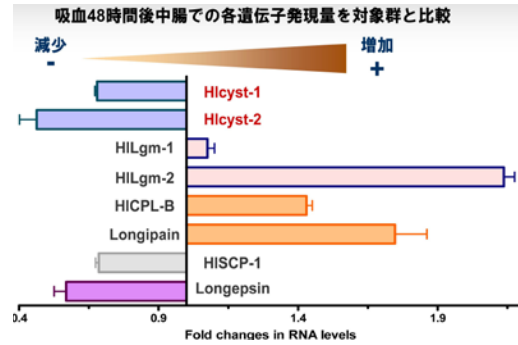


図 4 H1CPL 発現抑制による HbDC 参画分子へ影響

④マダニ中腸において H1CPL とその内在性インヒビター H1cyst-1, -2 は連携・協調しながら機能し、Hb 分解に重要な役割を果たしていることが分かった。中腸上皮における Hb 分解は、H1CPL、H1cyst-1 及び-2 などの HbDC 参画分子によって時空間的に制御されていることが示され、中腸でネットワーク化された HbDC の存在が強く示唆された。マダニ吸血消化の分子基盤を支える H1CPL、H1cyst-1 及び-2 などの HbDC 参画分子は新規抗マダニ薬の標的分子として有望であると考えられる。

⑤キモトリプシン様インヒビターである H1ChI は、アミノ酸 82 残基、分子量 9.1kDa で構成され、定量 PCR による解析の結果、H1ChI は、吸血時に発現が増強されており、幼ダニ、若ダニでは吸血開始 96 時間後に、成ダニでは吸血開始 120 時間後において最も高い発現レベルを示した。免疫蛍光抗体法では、H1ChI の陽性反応は中腸上皮細胞・ヘモサイトの細胞質内に確認された。組換え H1ChI は、ウシ膵臓由来  $\alpha$  キモトリプシンの蛍光基質およびカゼインに対する加水分解活性を顕著に阻害したが、ウシ膵臓トリプシンに対する阻害活性は低く、ブタ由来エラスターゼに対しては殆ど阻害活性を示さなかった。H1ChI ノックダウンマダニでは対照群 (*dsma1E* マダニ) と比較して吸血の進行が顕著に阻害され、それに伴って飽血時体重の著しい減少や、産卵数、孵化率の低下が見られた。H1ChI はキモトリプシンに対しては顕著

な活性阻害作用を示したが、他のトリプシンやエラスターゼに対しては殆ど阻害作用を示さなかったことから、セリンプロテアーゼの中でも特にキモトリプシンの加水分解活性を特異的に阻害するインヒビターであると考えられた (図4)。

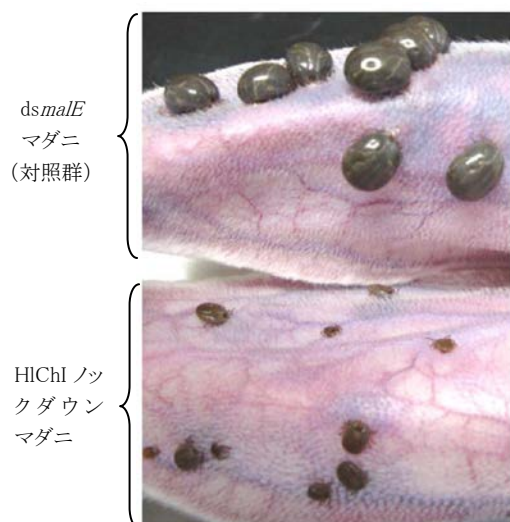


図4 ウサギの耳への吸血試験によって発育不全が惹起されたHIChIノックダウンマダニ

## (2) バベシア原虫の伝搬を制御するヘモグロビン分解経路

我々はロンギパインがバベシア原虫の伝搬を制御することを明らかにしてきたが、アレキ解析の結果、ヘモグロビン分解経路参画分子がバベシア原虫の伝搬に深く関与することを見出した。すなわち、*B. gibsoni* 寄生率の異なる2種類のBgH1Mg (寄生率11.1、0.49%)において、全プローブの3.2%の遺伝子発現が2倍以上、2.6%の遺伝子発現が0.5倍以下に変動していた。また、上方変動した遺伝子には蛋白質分解酵素をコードする遺伝子が複数(22%)含まれ、特にヘモグロビン分解経路参画分子(H1SP, Longepsin, Longipain, H1SCP1, H1Lgm, H1Lgm2, H1LAP, H1LAP2)に着目し、サンプル数(寄生率19.6、17.1、22.0%)を追加して、定量PCRによる発現量の比較を行ったところ、4種類の遺伝子(Longepsin, H1SCP1, H1LAP, H1LAP2)が寄生率に対して負の相関を示した( $P < 5\%$ )。以上の成績から、マダニにおける*B. gibsoni*伝搬は、マダニのHbDCが重要な役割を果たしていることが分かった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- ① Anisuzzaman, Islam MK., Alim MA. Alim,

Miyoshi T, Hatta T, Yamaji K, Matsumoto Y, Fujisaki K, Tsuji N. (2011). Longistatin, a salivary-gland protein from the disease vector tick with two calmodulin-like domains, functions as a serine protease. *Mol Biochem Parasitol.* 182, 45-53. 査読有.

DOI.org/10.1016/j.molbiopara.2011.12.002

- ② Anisuzzaman, Islam MK, Alim MA, Miyoshi T, Hatta T, Yamaji K, Matsumoto Y, Fujisaki K, Tsuji N. (2011). Longistatin, a novel plasminogen activator from vector ticks, is resistant to plasminogen activator inhibitor-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 413, 599-604. 査読有.

DOI.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.009

- ③ Yamaji K, Tsuji N, Miyoshi T, Islam MK, Hatta T, Alim MA, Anisuzzaman, Kushibiki S, Fujisaki K. (2010) Hlcyst-1 and Hlcyst-2 are potential inhibitors of H1CPL-A in the midgut of the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. *J Vet Med Sci.* 72, 599-604. 査読有.

DOI.org/10.1292/jvms.09-0561

- ④ 辻 尚利 (2011) マダニの吸血調節物質. *日本獣医師会雑誌.* 64巻4号:263-267. 査読無.

<http://iss.ndl.go.jp/books/R100000002-I000000018522-00>.

- ⑤ 辻 尚利、藤崎 幸蔵 (2011) マダニから学ぶバベシア症制御の手がかり—感染症研究のあらたなパラダイム形成をめざして. *医学のあゆみ.* 236巻4号:289-296. 査読無.

<http://www.fujisan.co.jp/product/116/b/642718/>

- ⑥ 辻 尚利、藤崎 幸蔵 (2012) 自然免疫の応答と制御—その共通性と多様性. マダニの生存戦略と病原体伝播. *化学と生物.* 50巻2号:119-126. 査読無.

[http://www.jsbba.or.jp/pub/journal\\_kasei/kasei\\_contents/vol50\\_2\\_2012.html](http://www.jsbba.or.jp/pub/journal_kasei/kasei_contents/vol50_2_2012.html)

[学会発表] (計3件)

- ① Abdul Alim, Khyrul Islam, Anisuzzaman, 三好 猛晴, 八田 岳土, 山地 佳代子, 松林 誠, 藤崎 幸蔵, 辻 尚利. H1ChI, a blood induced Kunitz-like protein from the hemocytes of the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, is a potent chymotrypsin inhibitor. 第152日本獣

医学会学術集会. 2011年9月21日. 大阪府立大学(堺市)

- ② 八田 岳士、松林 誠、三好 猛晴、アニスザマン、アリム アブドゥル、山地佳代子、藤崎 幸蔵、辻 尚利. バベシア原虫 *Babesia gibsoni* の寄生に伴うフタトゲチマダニ中腸の分子応答. 第152日本獣医学会学術集会. 2011年9月21日. 大阪府立大学(堺市)
- ③ 山地 佳代子、辻 尚利、三好 猛晴、八田 岳士、M. Abdul Alim, Anisuzzaman、櫛引 史郎、藤崎 幸蔵. マダニ中腸におけるシステインプロテアーゼとその内在性インヒビターの役割. 第79回日本寄生虫学会大会. 2010年5月21日. 旭川市大雪クリスタルホール(旭川市)

[図書] (計1件)

- ① 辻 尚利、他(2011) 医歯薬出版. 知っておきたい動物の感染症(編集:佐藤 真澄、堤 寛). pp.124-131.

[その他]

<http://www.niah.affrc.go.jp/collab/person/tsuji/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

辻 尚利 (TSUJI NAOTOSHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所・細菌・寄生虫研究領域・主任研究員

研究者番号: 70355171

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

八田 岳士 (HATTA TAKESHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所・細菌・寄生虫研究領域・研究員

研究者番号: 00455304